PHARMAKOGNOSTISCHE IDENTIFIZIERUNG VON SIAMESISCHEN DROGEN MITTELS MIKRO-SCHMELZPUNKT-BESTIMMUNG.

Rudolf Schaller.

Arbeit aus der Pharmakognostischen Abteilung des Dept. of Medicinal Science. 1943/44.

Die Schmelzpunktbestimmung ist eine unerlaessliche Methode zur Erkennung chemischer Substanzen und wird mit Recht von allen Arzneibuechern zur Identifizierung und zum Nachweis der Reinheit gefordert. Bei pflanzenanalytischen Arbeiten, insbesondere nach Material und Zeit sparenden Mikro-Methoden fallen nun haeufig Substanzen oder Reaktionsprodukte in Mengen von nur wenigen Milligrammen oder weniger an, deren Identifizierung mit der gewoehnlichen Schmelzpunktmethode unmoeglich waere. Hier wird die Mikro–Schmelzpunkt–Bestimmung unerlaesslich, die gegenueber der Makro–Methode folgende Vorzuege aufweist:

1) Die fuer eine Schmelzpunktbestimmung noetige Substanzmenge betraegt meist weniger als ein Milligramm.

2) Die Beobachtung des Schmelzvorganges unter dem Mikroskop gestattet die Erkennung weiterer charakteristischer Eigenschaften der Substanz, wie Sublimationsvermoegen und Modifikationsaenderungen.

3) Das Arbeiten mit dem elektrischen Mikroschmelzpunktapparat erfordert weniger Zeit.

4) Die Heizbedingungen, insbesondere die Heizgeschwindigkeit, die bekanntlich auf den Schmelzpunkt von ausschlaggebendom Einfluss ist, kann mit dem Mikro-Schmelzpunktapparat sehr gleichmaessig eingehalten und jederzeit unter gleichen Bedingungen wiederholt werden, womit zuverlaessige und vergleichbare Werte gewaehrleistet sind.

Von Mikroschmelzpunktapparaten sind neben vielen anderen zwei erfolgreiche Konstruktionen bekannt geworden, der von Kofler (1) und der von Klein (2). Da infolge der Kriegsumstaende der Bezug eines Apparates nicht moeglich war, wurde in Anlehnung an den Koflerschen Apparat in der Werkstatt des Dept. of Science ein Geraet gebaut, das sich trotz der beschraenkten technischen Mittel die uns zur Verfuegung standen, nach zahlreichen kritischen Proben als ausgezeichnet brauchbar erwies. Das Geraet besteht aus einer Metallkapsel von 8 cm Durchmesser und 3 cm Hoehe, mit einer zentralen Oeffnung von 2 mm Durchmesser. In der Kapsel liegt die elektrische Heizspirale zwischen keramischem Isoliermaterial. Der elektrische Anschluss erfolgt mittels isolierter Steckdose. Fuer das Stabthermometer ist 1 mm unter der Oberflaeche des Heiztisches eine horizontale Oeffnung vorgesehen. Dar Thermometer wird durch eine geschlitzte Metallhuelse geschuetzt. Die Metallkapsel ist unten durch eine Marmorplatte abgeschlossen. Die eigentliche Heizplatte von 30 mm Durchmesser ist 1 mm ueber der Tischflaeche erhaben, ebenso wie ein schmaler Rand. Zum Abschluss der umgebenden Luft wird auf den Heiztisch, je nach dem ein lang oder kurzbrennweitiges Objektiv benutzt wird, ein schmaler Asbestzementring von 5 oder 10 mm Hoehe aufgelegt, auf dem dann die abschliessende Glasplatte liegt. Wo bei Arbeiten mit Temperaturen um 300° die Deckplatten haeufig zerspringen, hat sich das Abdecken mit zwei normalen Objekttraegern, die glatt aneinander liegen als sehr brauchbar erwiesen. Man muss dann nur darauf sehen, dass die Trennlinie ausserhalb des Beobachtungskegels liegt.

Die Heizkapsel wird mit einer grossen Klammer an einem Bunsenstativ befestigt und darueber ebenfalls mittels Klemme ein monokularer Ausziehtubus eines Mikroskopes. Ein Mikroskopspiegel ist unterhalb der Sehoeffnung angebracht. Diese aue der Not der Zeit geborene Anordnung hat sich sehr gut bewaehrt und bietet noch den Vorteil, dass bei Arbeiten, bei denen nur kurzzeitige Beobachtung mit dem Mikroskop notwendig ist, wie z. B. bei Mikrosublimation, dieses weggeklappt werden kann und somit die Objektive dem laengeren Einfluss der Hitze entzogen sind.

Als Objektive verwenden wir je nach der notwendigen Vergroesserung 3 x von Zeiss und 6 x von Leitz. Die Objektive werden direkt in die untere Tubusoeffnung eingeschraubt. Der Auszug ist dann nur 13 cm, kann aber mittels Zwischenhuelse auf die fuer Zeiss oder Leizt Objektive vergesehene Auszuglaenge von 16 bezw. 17 cm gebracht werden. Als Okulare werden 12 x und 15 x gebraucht, womit lineare Vergroesserungen bis zu 90 fach erzielt werden, die sich in der Mehrzehl der Faelle als genuegend erwiesen haben. Die groesste Schwierigkeit bot die Beschaffung eines geeigneten Thermometers. Das von uns benutzte zeigt eine ertraegliche Gleichfoermikeit, sodass es nach ergaenzender Eichung mit einer Anzahl reiner Pruefsubstanzen einwandfreie Ergebnisse zeigt.

Zum Heizen wird Wechselstrom von ca. 100 Volt der Lichtleitung entnommen und mittels Schieberwiderstand geregelt. Die Heizung kann so reguliert werden, dass unterhalb des zu erwartenden Schmelzpunktes die Temperatur ziemlich rasch steigt, 10 bis 20 Grad in der Minute. In der Naehe des Schmelzpunktes wird die Heizung so reduziert, dass die Temperatur nicht mehr als 6 Grad in der Minute ansteigt. Es hat sich bei unserem Apparat als praktisch erwiesen ca. 2 bis 3 Grad unterhalb des Schmelzpunktes die Heizung ganz abzustellen. Die Temperatua steigt dann noch langsam um 4 bis 6 Grad uzd bleibt dann kurze Zeit stehen.

Die eigentliche Schmelzpunktbestimmung erfolgt nach Kofler wie folgt: Die Substanz deren Schmelzpunkt bestimmt werden soll, wird auf einem kleinen Objekttraeger ca. 26 x 26 mm = 1/3 eines normalen Objekttraegers, mit einem Deckglass oder bei kleinsten Mengen einem Deckglasslitter bedeckt. Groessere Kristalle werden vorher mittels Glasstab zerdrueckt. Vorheriges Trocknen det Substanz ist meist nicht notwendig, da geringe Feuchtigkeitsmengen beim Erwaermen zwischen Objeckttraeger und Deckglas leicht entweichen koennen.

Mikrosublimate werden zweckmaessig gleich auf 1/3 Objecktraegern erzeugt und wie oben behandelt.

Als Schmelzpunkt liest man die Temperatur ab, bei der die kleinsten Kristalle oder Teilchen vollstaendig zerflossen sind und von den grossen noch Reste in den Schmelztropfen sichtbar sind. Bei manchen Substanzen, die beim Abkuehlen sofort wieder aus der Schmelze auskristallisieren, laesst sich unter dem Mikroskop der Schmelzpunkt als jene Temperatur feststellen, bei der feste und fluessige Phase nebeneinander bestaendig sind. Erhoeht man die Temperatur ein wenig so nimmt die Zahl und Groesse der Kristalle ab, laesst man nur ganz wenig abkuehlen, so beginnt wieder der Kristallisationsprozess.

Bei den meisten Substanzen beobachtet man wahrend des Erhitzens vor dem Erreichen des Schmelzpunktes mannigfache Veraenderungon, die darin bestehen, dass die Substanz sich umlagert und vor allem, dass sie vom Objekttraeger auf die Unterseite des Deckglases sublimiert. Diese Sublimation kann erst unmittelbar vor Erreichen des Schmelzpunktes oder schon viele Grade vorher erfolgen. Das Aussehen und die Form dieser Kristalle ist sehr verschieden, neben kristallinen Sublimaten kommen auch Troepfchen vor (Kondensat). In manchen Faellen sublimiert nur ein Teil in anderen Faellen die Gesamtmenge der Substanz an das Deckglas. Im letzteren Fall sieht man nur die Sublimate schmelzen, im ersten Fall sowohl die Ursubstanz als auch das Sublimat. Bei der Schmelzpunktbestimmung unter dem Mikroskop kann man demnach mehr charakteristische Eigenschaften feststellen, als bei der ueblichen Bestimmung im Kapillarroehrchen.

Kristallwasserhaltige Substanzen zeigen nicht selten andere Mikroschmelzpunkte als bei der ueblichen Bestimmung im Kapillarrohr, und zwar teils hoeher teils niedriger. Wenn ein hoeherer Schmelzpunkt gefunden wird liegt der Grund darin, dass im Kapillarrohr die kristallwasserhaltige Substanz schmilzt, waehrend beim Erhitzen zwischen Objekttraeger und Deckglas das Kristallwasser kurz vor der Schmelztemperatur des Hydrates entweicht, sodass man bei der Mikrobestimmung den hoeher iegenden Schmelzpunkt der wasserfreien Substanz erfasst.

Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Makro- und Mikroschmelzpunktbestimmungen sprechen nicht gegen die Mikromethode, sondern beweisen, dass die Mikromethode sehr viel mehr Aufschluesse bietet als das uebliche Verfahren. Allerdings ergibt sich, dass Makro: und Mikroschmelzpunkte nicht in allen Faellen unmittelbar vergleichbar sind. Es muss daher stets ausdruecklich vermerkt werden, wenn ein Schmelzpunkt swischen Objekttraeger und Deckglas unter dem Mikroskop bestimmt wurde,

Auf die verschiedenen Erscheinungen der Modifikationen polymorpher Substanzen, die bei der Bestimmung des Mikroschmelzpunktes unter Umstaenden beobachtet werden, soll hier nicht naeher eingegangen werden, zumal sie vorlaeufig fuer pharmakognostische Arbeiten ohne Bedeutung sind. Sehr wichtig wird die Mikroschmelzpunktbestimmung jedoch zur Identifizierung mikrochemischer Faellungen, insbesondere dann, wenn ein Reagenz, wie z.B. Pikrinsaeure mit verschiedenen Koerpern gleich aussehende Reaktionsprodukte liefert, die nach Farbe und Kristallform nicht zu unterscheiden sind, oder die wie viele der mit allgemeinen Alkaloid-Reagentien erhaltenen Niederschlaege amorph sind.

Wir haben die Mikroschmelzpunktbestimmung zur einwandfreien Erkennung von einheimischen Drogen in Pulverform bereits in mehreren Faellen dort erfolgreich anwenden koennen, wo Identitaetsreaktionen fuer die Inhaltsstoffe bisher unbekannt sind.

Der Nachweis von Mitragyna - Blaettern (Folia Mitragynae speciosae) (deren Anbau und Verkauf bekanntlich gesetzlich verboten ist) in pulverfoermigen Arzneimischungen besonders Tabletten, machte eine bestaetigende Nachweisreaktion fuer die Mitragyna- Alkaloide wuenschenswert, da die allgemeinen Alkaloidreagentien wie Wagner's - und Mayer's Reagenz nur amorphe nicht spezifische Niederschlaege liefern.

Mit der folgenden Methode gelingt es leicht mit der Menge Material die einem lufttrockenen Blatt mittlerer Groesse entspricht, ca. 1-1,5 Gramm, einen einwandfreien Identitaetsnachweis durch die Mikroschmelzpunktbestimmung des Pikrates zu fuehren. Bei

einiger Uebung genuegt sogar die halbe Menge. Das lufttrockene Drogenpulver wird mit ein wenig gewaschenem Sand im Moerser feinst verrieben, dann mit 15 ccm einer Mischung aus 9 Teilen Chloroform und 1 Teil Alkohol 95 % am Rueckflusskuehler 15 Minuten am Sieden erhalten. Der Extrakt wird abgegossen und filtriert. Die Extraktion wird mit weiteren 10 ccm Chloroformgemisch wiederholt, die filtrierten Extrakte vereinigt und auf dem Wasserbad das Loesungsmittel verjagt. Der durch Chlorophyll gruen gefaerbte schmierige Rueckstand wird mit 5 ccm 1 % Salzsaeure aufgenommen, filtriert und mit 1 % Pikrinsaeureloesung gefaellt. Es ist wichtig, dass die Faellung in der Kaelte geschieht, da der Niederschlag im warmen Wasser leicht loeslich ist. Die Faellung erfolgt am besten in einem kleinen Reagenzglas von 6 - 10 ccm Inhalt. Der Niederschlag wird mittels Zentrifuge abgeschleudert, dekantiert, mit kaltem Wasser (etwa 10°) aufgeschuettelt und noch 5 mal mit je 2 - 3 ccm in gleicher Weise ausgewaschen und abgeschleudert. Der Niederschlag wird dann trocknen lassen, wobei Temperaturen ueber 50° vermieden werden muessen, da der feuchte Niederschlag schon unter 100° schmilzt bzw. sich loest. Der getrocknete Niederschlag wird mittels Mikrospatel abgekratzt und zur Mikroschmelzpunktbestimmung auf einen 1/3 Objekttraeger gebracht.

Das Mitragyninpikrat (es handelt sich wahrscheinlich um die Faellung wenigstens zweier verschiedener Basen) stellt eine gelbgruene amorphe Masse dar, die beim Erhitzen ueber 100° sich allmaehlich gelbbraun faerbt, ab 160° ein feinnadliges Sublimat bildet, ab 178° rot durchscheinend wird und ab 180° unter Zersetzung schmilzt, unter Bildung gelbdurchscheinender Blasen. Die Schmelze kristallisiert nicht beim Abkuehlen.

Eine Droge die in der Thai - Pharmazie als Dysenterie - Mittel immer mehr an Bedeutung gewinnt, ist die Rinde von Holarrhena antidysenterica, - Cortex Holarrhenae antidysentericae. Histologische Befunde und allgemeine Alkaloidfaellungsreaktionen ergaben, dass zwei verschiedene Rinden unter demselben Namen im Markt sind,

von denen eine keine Alkaloide enthaelt bei sonst sehr aehnlicher histologischer Eigenart. Ob es sich dabei um eine andere Art, eine Varietaet oder um eine Rinde handelt, die entweder zur unrechten Zeit gesammelt ist oder infolge schlechter Lagerung verdorben ist, konnte bisher nicht festgestellt werden. Soweit die Droge als Ganzes vorliegt ist eine rein histologische Identifizierung noch moeglich. In Pulver oder Tablettenform ist eine einwandfreie Erkennung erschwert. Hier macht sich der Mangel an spezifischen Nachweisreaktionen bemerkbar. Alle mikrochemischen Faellungen von Holarrhena - Auszuegen mit Wagner's - Reagenz, Mayer's - Reagenz, Pikrinsaeure etc. sind amorph und nicht charakteristisch. Es gelang auch hier aus dem ammoniakalischen Chloroform - Extrakt das Pikrat darzustellen und dessen Mikroschmelzpunkt zu bestimmen. Der Vorgang ist der gleiche wie oben beschieben, nur dass als Extraktionsmittel sich Chlorofrom, dem 5 % Ammoniak zugesetzt wird, besser bewaehrt hat.

Das Holarrhena Pikrat (es handelt sich sicher um ein Gemisch mehrerer Basen) stellt eine feinkoernige, mikrokristalline Masse dar, schwach doppelbrechend, die ohne zu sublimieren bei 127 - 128° zu gelben Tropfen schmilzt, die beim Abkuehlen nicht kristallisieren. Ab 110° wurde ein geringes tropfiges Kondensat um die Substanz, jedoch nicht am Deckglas beobachtet.

Wir stehen erst am Anfang unserer systematischen Arbeit, die morphologisch - histologischen Beschreibungen wichtiger Thai Drogen durch mikrochemische Identitaetsreaktionen zu ergaenzen. In vielen Faellen, in denen die histologische Gleichartigkeit von Paralleldrogen oder unbeschriebenen Varietaeten eine einwandfreie Identifizierung nicht zulaesst, wird die Mikroschmelzpunktbestimmung geeigneter Niederschlaege berufen sein, den ergaenzenden chemischen Nachweis zu liefern. Die Methode versagt nur dann, wenn die Wirkstoffe mit keinem Faellungsmittel reagieren oder wenn die Niederschlaege so leicht loeslich sind, dass ein Auswaschen unmoeglich ist. Unter den derzeitigen Kriegsverhaeltnissen hat die Mikroschmelzpunktbestimmung umso groessere Bedeutung, als sie

gestattet mit geringsten Chemikalienmengen einwandfreie Nachweise zu fuehren, abgesehen davon, dass viele der sonst zum Nachweis von Arzneimitteln gebrauchten Reagenzien zur Zeit ueberhaupt nicht zu beschaffen sind.

Zur Technik der Mikroschmelzpunktbestimmung an Niederschlaegen hat sich uns folgende modifizierte Arbeitsweise bewaehrt, besonders an amorphen Niederschlaegen, die beim Waschen leicht abgeschwemmt werden. Der Niederschlag wird zwischen Objekttraeger und Deckglas ausgewaschen. An den Rand des viereckigen Deckglases wird auf beiden Seiten je ein 3–4 mm breiter Schutzstreifen aus Filtrierpapier gelegt. Weiter wird auf einer Seite ein 2 cm breiter und 6–7 cm langer Filtrierpapierstreifen angelegt, der die Waschfluessigkeit aufsaugt und nach Bedarf gewechselt wird. Die Waschfluessigkeit wird mittels Tropfroehrchen auf den schmalen Schutzstreifen gebracht und, falls Faellung mit Pikrinsaeure erfolgte, so lange ausgewaschen bis die Waschfluessigkeit farblos erscheint. Der gewaschene Niederschlag wird auf dem Objekttraeger oder am Deckglas eintrocknen lassen, was meist ohne Erwaermen moeglich ist. Der eingetrocknete Niederschlag wird mittels Mikrospatel zusammengekratzt und zur Mikroschmelzpunktbestimmung auf einen 1/3 Objekttraeger gebracht. Wenn die Menge zur Uebertragung auf einen anderen Objekttraeger zu gering ist, wird der Objekttraeger zerschnitten und unmittelbar zur Bestimmung benutzt. Falls der Niederschlag zum groessten Teil am Deckglas haftet, wird dieses wie ueblich Schicht nach unten auf einen 1/3 Objekttraeger gelegt.

Beim Arbeiten mit dem Mikroschmelzpunktapparat (der sich ausserdem mit Vorteil zur Mikrosublimation eignet, worueber in einer getrennten Arbeit berichtet wird) hat sich die kraeftige Waermestrahlung fuer den Beobachter als unangenehm erwiesen. Wenn zahlreiche Schmelzpunktbestimmungen hintereinander gemacht werden, besonders bei Temperaturen zwischen 200 und 300° wurde die anhaltende Hitzestrahlung bei der tropischen Raumtemperatur von meist ueber 30° als sehr laestig empfunden.

Es wurde nach Mitteln zur Abstellung dieser subjektiven Beschwerden gesucht. Ein Abschirmen der Strahlen durch eine Asbestplatte waere moeglich, beeintraechtigt aber die Handlichkeit der Apparatur. Ein langer Schraegtubus vom Typ des Zeiss Monokni waere eine Loesung, die aber daran scheitert, dass derartige Geraete zur Zeit nicht zu beschaffen sind. So wurde eine horizontale Projektionskammer geschaffen. Der Beobachtungsstrahl wird ueber dem Okular mit einem Prisma um 90° auf die Mattscheibe abgelenkt. Die Beleuchtung erfolgt durch eine Niedervoltlampe. Obgleich unser Apparat ohne Kondensator arbeitet, ist die Helligkeit des projizierten Bildes auf der Mattscheibe so intensiv, dass Beobachtung im nicht verdunkelten Arbeitsraum moeglich ist. Die Belaestigung durch die Waermestrahlen faellt fort, die Beobachtung ist nicht ermuedend und obendrein kann der Vorgang von mehreren Personen gleichzeitig wahrgenommen werden, ein Vorteil, der fuer Instruktionszwecke wertvoll ist.

Es ist mir eine angenehme Pflicht Seiner Exzellenz Herrn Minister des Gesundheitswesens Dr. Prachuap Bunnag, dem damaligen Leiter des Department of Science, fuer die vielfache Hilfe und Ueberlassung technischen Materials herzlich zu danken, ohne die der Mikroschmelzpunktapparat nicht haette gebaut werden koennen. Meine Mitarbeiter Frau Chalermwan und Nai Ujem fuehrten einige Kontrollbestimmungen durch, wofuer ich ihnen bestens danke.

Zusammenfassung: Die Vorteile der Mikroschmelzpunktbestimmung gegenueber der Kapillarrohrmethode werden erklaert. Die Anwendung zur Identifizierung zweier Thai Drogen und zwar Mitragyna - Blaetter (Folia Mitragynae speciosae) und Holarrhena Rinde (Cortex Holarrhenae antidysentericae), fuer die bisher Identitaetsreaktionen nicht bekannt sind, wird einschliesslich der Arbeitsmethode beschrieben. Zum Schluss wird die verbesserte Form des Projektions Mikroschmelzpunktapparates erwaehnt.

สรุปความ เรื่องนี้แสดงถึงคุณสมบัติพิเศษของวิธีตรวจหาจุดหลอมตัวโดยใช้กล้องจุลทัศน์ (micromelting point determination) เปรียบเทียบกับวิธีเดิมที่ใช้หลอดแก้ว (capillary tube method) อนึ่งได้อธิบายโดยละเอียดถึงการใช้วิธีตรวจอย่างใหม่นี้ สำหรับตรวจสรรพคุณของตัวยาไทยที่สำคัญ ๆ เช่น ใบกะท่อม (Mitragyna leaves) และเปลือกโมกหลวง (Holarrhena bark), รวมทั้งการแสดงเครื่องมือ ซึ่งใช้ความร้อนของไฟฟ้าตรวจหาจุดหลอมตัวโดยกล้องจุลทัศน์ อันเป็นเครื่องมือที่ทำขึ้นเองในโรงงานของกรมวิทยาศาสตร์.

Summary. The advantages of micromeltingpoint determination compared with the conventional capillary tube method are shown. The application of the new method in the pharmacognostic identification of siamese potential drugs e.g. Mitragyna leaves "bei gatom" and Holarrhena bark "plueg mog luang" is explained in detail, including an electrically heated micromeltingpoint apparatus, made in the workshop of the Dept. of Science.

Literatur:

1) L.u.A. Kofler: Mikroskopische Methoden in der Mikrochemie.
2) Klein: Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. 1
3) L. Kofler: Mikroskopische Methoden zur Identifizierung organischer Substanzen.
4) R. Schaller: Pharmakognostische Berichte des Dept. of Medical Science, unveroeffentlicht.
5) siehe auch: Schaller: "Beitrag zur Pharmakognosie der Arznei- und Wirtschaftspflanzen Siams," im gleichen Heft.